1934
Lane Medical Library

Aus der
Bayerischen Veterinärpolizeilichen Anstalt in Schleißheim
(Vorstand: Direktor Dr. L. DRESCHER)

*

Die Unterscheidung von Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillen mittels der Haemolyse-Reaktion im Reagenzglas

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Veterinärmedizinischen Fakultät der Hessischen Ludwigs-Universität zu Gießen

Vorgelegt von
GEORG GRIMM
appr. Tierarzt aus München

Gießen 1934

Aus der
Bayerischen Veterinärpolizeilichen Anstalt in Schleißheim
(Vorstand: Direktor Dr. L. DRESCHER)

*

Die Unterscheidung von Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillen mittels der Haemolyse-Reaktion im Reagenzglas

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Veterinärmedizinischen Fakultät der Hessischen Ludwigs-Universität zu Gießen

Vorgelegt von
GEORG GRIMM
appr. Tierarzt aus München

Gießen 1934

Gedruckt mit Genehmigung der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Gießen
Referent: Professor Dr. Zwick

Meiner Frau zugeeignet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154009_0061

Schrifttum

Der Rauschbrand ist mit Sicherheit weder klinisch noch pathologisch-anatomisch vom Pararauschbrand zu trennen.

Nach der „Gemeinfaßlichen Belehrung über die nach dem Viehseuchengesetz vom 26. Juni 1909 der Anzeigepflicht unterliegenden Seuchen, bearbeitet im Reichsgesundheitsamt zu Berlin (Ausgabe 1931)" ist der Rauschbrand „eine ansteckende, durch den Rauschbrandbazillus verursachte, schnell verlaufende Krankheit." Durch diese eindeutige, aetiologische Festlegung des Begriffes „Rauschbrand" ist letzten Endes die Diagnose an den Nachweis des Rauschbranderregers gebunden.

Zur Ermittlung des Rauschbrandbazillus bedient man sich seit Einführung der Traubenzuckerblutagarplatte nach Zeissler[39]) fast nur noch der Oberflächenkultur. Neuerdings findet auch die Blutagarplatte nach Fortner[8]) Verwendung. Die Veterinärpolizeiliche Anstalt benützt z. Z. beide Verfahren nebeneinander mit den in der Inaug. Diss. von König[20]) bezw. von Schreiber[32]) niedergelegten Abweichungen.

Zur Ergänzung der bakteriologischen Feststellung des Rauschbrandbazillus stand früher nur der Tierversuch Foth[15]) zur Verfügung. Die Möglichkeit einer Züchtung von Subkulturen nach Fortner[9]) ersetzt nunmehr in den meisten Fällen den Tierversuch.

Eine weitere Möglichkeit, vom Tierversuch Abstand nehmen zu können, eröffnet die Mitteilung von M. Bernard[2]), wonach man mittels der Haemolyse-Reaktion im Reagenzglas Rauschbrand- von Pararauschbrandbazillen trennen kann. Die Beobachtung, daß Rauschbrandkolonien auf Hammelblutagarplatten besonders starke Haemolyse bilden, veranlaßte Reagenzglasversuche. Um etwaige störende Komponenten auszuschalten, wurde dabei mit gewaschenen Hammelblutkörperchen gearbeitet. Bestimmte Mengen von Flüssigkeit aus gut gewachsenen Leberbouillonkulturen des Rauschbrandes bezw. Pararauschbrandes wurden mit einer Hammelblutkörperchenaufschwemmung bestimmter Dichte und Menge bei Zimmertemperatur

im Reagenzglas zusammengebracht. Es ist dann bei Rauschbrand Haemolyse, bei Pararauschbrand Senkung der roten Blutkörperchen ohne Haemolyse eingetreten. Bei einigen Rauschbrandstämmen ist die Auflösung der roten Blutkörperchen fast augenblicklich erfolgt, während andere langsamer lösten. Im allgemeinen war die Lösung in einer halben Stunde beendet; die höchste Zeitdauer betrug einmal 2 Stunden. Bernard[2]) führt die lange Zeitdauer hier auf den geringen Gehalt an Bazillen in den schlecht gewachsenen Kulturen zurück. Im ganzen wurde die „Hammelblutkörperchenreaktion" an 43 Rauschbrand- und 41 Pararauschbrandstämmen verschiedenster Herkunft geprüft. Die Blutkörperchen stammten von 2 verschiedenen Hammeln.

Sämtliche Stämme hat Bernard im Kulturverfahren und im Tierversuch geprüft und Kolonien verschiedenster Wuchsform von der Zeissler-Blutplatte in Leberbouillon abgeimpft. Alle Kulturstämme, wie auch aus dem Tierkörper gewonnene Kulturen, ergaben in den Reagenzglasversuchen mit Hammelblutkörperchen das Gleiche: Haemolyse bei Rauschbrand, Senkung der roten Blutkörperchen bei Pararauschbrand.

Durch Kokken verunreinigte Kulturen führten zu Fehlresultaten, desgleichen einige aus anderen Instituten bezogene Rauschbrandkulturen, die ohne Weiterzüchtung sofort für den Haemolyseversuch verwendet wurden. Diese Stämme waren in einer Leberbouillon gezüchtet, die sehr viel Leberbrei, aber nur ganz geringe Mengen überstehender Bouillon enthielt. Beim Abpipettieren von Rauschbrandkulturen ließ es sich nicht vermeiden, daß feinste Leberteilchen mit aufgesogen wurden, die allem Anschein nach im Haemolyseversuch die Reaktion beeinflußten; nach Züchtung dieser Stämme in Leberbouillon eigener Herstellungsart ist die Haemolyse schnell und einwandfrei eingetreten. Fehlresultate stellten sich auch ein, wenn Kulturen, die mit Muskelstücken oder Muskelpulver von an Rauschbrand oder Pararauschbrand verendeten Tieren angelegt waren, verwendet wurden.

Daß rote Blutkörperchen durch Bakterien gelöst werden können, beobachtete bereits Rob. Koch[18]) im Jahre 1884. Erst als Ehrlich[5]) im Jahre 1898 die Aufmerksamkeit der Untersucher auf das „Haemolysin" in Tetanuskulturfiltraten lenkte und Madsen[23]) auf dessen Anregung hin die Wirkungsweise der Haemolysine und

ihrer Antitoxine im Reagenzglase in methodischen Untersuchungen verwertete, begann die systematische Bearbeitung der Haemolysine aus Bakterienkulturen. Eijkmann[6]) verwendete bereits im Jahre 1909 die Blutagarplatte zum Nachweis von Bakterienhaemolysinen.

In Kulturen des Fraenkelschen Gasbrandbazillus (Baz. Welchii) hat Korentschewsky[19]) 1909 eine geringe Haemolysinbildung beobachtet. Simonds[33]) untersuchte 1915 17 Gasbrandstämme; er fand bei einigen eine sehr starke, bei anderen eine nur schwache oder auch keine Haemolysinbildung. Im gleichen Jahre wiesen Costa und Troisier[4]) in flüssigen Gasbrandkulturen, die durch Absetzen oder Abzentrifugieren bazillenfrei gemacht wurden, Haemolysine gegen Meerschweinchenblutkörperchen nach. Durch $^1/_2$ stündiges Erhitzen auf 56° wurde das „Haemolysin" zerstört. Im allgemeinen ging die Haemolysinbildung mit der Virulenz oder zumindest mit der fermentativen Aktivität der Stämme parallel. Bull und Pritschnett[3]) beobachteten 1917 nach intravenösen Injektionen von Filtraten des Baz. Welchii bei Kaninchen und Tauben starken Zerfall von roten Blutkörperchen. Eingehende Studien über das Haemotoxin des Baz. Welchii teilt Ouranoff[27]) im Jahre 1917 mit. Der genannte Erreger bildet in Bouillonkulturen ein „Haemotoxin", das auf die Blutkörperchen von Mensch, Hund, Schwein, Rind, Hammel, Pferd, Meerschweinchen, Kaninchen, Ratte, Maus, Huhn, Taube wirkt. Bei Meerschweinchen-, Kaninchen-, Hühner- und Taubenblut bleiben dabei die Stromata intakt, bei den anderen Blutarten werden sie aber aufgelöst. Die Menge des gebildeten Haemotoxins ist je nach dem Kulturstamm verschieden. Die Fähigkeit, Haemotoxine zu bilden, kann bei der Fortzüchtung verloren gehen und wieder von neuem auftreten. Durch $^1/_2$ stündiges Erhitzen auf 60° wird das Haemotoxin zerstört. Auch bei 37° wird es nach einigen Tagen unwirksam, während es sich bei Zimmertemperatur mehrere Monate hält. Tageslicht zerstört es in wenigen Tagen. Chamberland- oder Berkefeldfilter halten es zum Teil zurück. Bei Vergiftung von Hühnern und Kaninchen mit dem Toxin tritt Haemoglobinurie auf, ein Beweis, daß es auch in vivo haemolitisch wirkt. Serumzusatz hemmt die Wirkung des Haemotoxins. Durch Immunisierung von Pferden mit Toxin wird diese

Serumwirkung bedeutend gesteigert. Kulturen, die das Haemolysinbildungsvermögen eingebüßt haben, zeigen dafür häufig Haemagglutinationswirkung.

Weinberg und Séguin[35]) konnten 1917 in 15—16 Stunden alten Kulturen bei 7 von 9 untersuchten Stämmen des Baz. Welchii starke Haemotoxine für Mensch-, Schaf- und Meerschweinchen-Erythrocythen nachweisen; bei 48 stündigen Kulturen fanden sie nur noch schwache Wirkung. Schloßberger[30]) stellte 1919 Haemotoxine des Baz. Welchii dar, die antigene Eigenschaften hatten; durch antihaemolytisches Serum gelang es mit Haemotoxin beladene Blutkörperchen noch einige Zeit vor der Auflösung zu bewahren. 1923 berichteten Henry[16]), Kadisch[17]) und Wuth[37]) über gelungene Herstellung des Haemotoxins von Baz. Welchii. Letzterer konnte es ohne Verlust filtrieren, fand es thermolabil und sehr wenig haltbar.

Daß auch der Novy'sche Bazillus des Malignen Oedems Haemotoxine bildet, haben bereits Weinberg und Séguin[35]) festgestellt. In vitro zerstörte die 10fache Verdünnung einer Vollkultur eine $5^0/_0$ige Blutkörperchenaufschemmung von Mensch, Schaf und Meerschweinchen. Sie fanden zwar konstant Haemotoxine beim Novy'schen Bazillus, doch waren diese viel schwächer als die des Fraenkelbazillus. Sie waren thermolabil und gingen nach $^1/_2$ stündigem Erwärmen bei 50^0 im Wasserbad zugrunde.

Auch in Kulturen des Pararauschbrands (Vibrio septique) wiesen bereits 1915 Nicolle, Césari und Raphael[26]) in Reagenzglasversuchen Haemotoxine gegen Mensch-, Pferd-, Hammel-, Kaninchen- und Meerschweinchenblutkörperchen nach. Die verschiedenen Stämme wirkten verschieden stark gegen die Blutkörperchen der verschiedenen Tierarten. Auch Weinberg und Séguin[35]) gewannen 1917 aus 16 stündigen Kulturen des Vibrio septique Haemolysine. $^1/_{10}$ ccm der Vollkultur löste die Erythrocythen von Mensch, Schaf und Meerschweinchen fast gleich gut. 1 Stamm löste in der Verdünnung 3 : 10 und 3 Stämme in der Verdünnung 5 : 10 eine $5^0/_0$ige Blutkörperchenaufschwemmung. Besonders eingehende Studien über das Haemolysin des Vibr. sept. hat 1919 Wuth[37]) angestellt. Er benützte 9—11 Tage alte Traubenzucker-bouillonkulturen, die er durch ein Membranfilter schickte. Schon nach 24 stündigem Wachstum konnte er das Lysin nachweisen;

das Gift löste Hammel-, Kaninchen-, Meerschweinchen- und Pferdeblutkörperchen auf, letztere am schwächsten. Durch $^1/_2$ stündige Erwärmung auf 46—50° wurde es zerstört. Auch hier hemmte Immunserum, in geringerem Grade sogar auch Normalpferdeserum die Wirkung stark.

Vom Rauschbrandbazillus erwähnt Zeissler[39]) nur, daß er „Haemotoxine" bilde. Der Bazillus histolyticus vermag dies angeblich nicht. Fortner[10]) spricht nur von einer intensiven Haemolyse der Rauschbrandkolonien auf seiner Blutagarplatte. Eisenberg[7]) fand in Kulturen des Bac. Chauvoei und Bac. oedematis maligni thermolabile Haemotoxine, die Meerschweinchenblut stärker als Hammelblut lösten.

Nach Přibram[29]) sind „Haemolysine" Sekretionsprodukte tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, welche die Erythrocythen einer oder mehrerer Tierarten auflösen. Die von Bakterien stammenden Haemolysine verhalten sich wie echte Toxine, sie sind also von den Bakterien durch Filtration zu trennen und erzeugen, in den Tierkörper verbracht, Antitoxine.

Die Fähigkeit, Erythrocythen bei direkter Berührung in längstens 2—3 Tagen aufzulösen, ist nach Přibram[29]) allen Mikroorganismen gemein, allerdings in verschiedenem Grade. Einige vermögen schon in flüssigen Nährmedien während ihres Wachstums Erythrocythen zu zerstören, andere nur bei Wachstum auf festen, blutkörperchenhaltigen Nährböden. Dies habe aber nichts mit Haemotoxinbildung zu tun, da ja erfahrungsgemäß die verschiedensten Einflüsse (osmot. Änderungen, Reaktionsänderung des Nährbodens u. a.) zu Haemolyse führen können. Unter „Haemolyse" versteht Přibram[29]) einen Vorgang, bei welchem das Protoplasma der Erythrocythen derartig geschädigt wird, daß das Haemoglobin in das umgebende Medium diffundiert. Dieser Vorgang ist stets auf eine physikalische oder chemische Schädigung des Protoplasmas zurückzuführen. Haemolyse tritt dann ein, wenn das dem Blut zugesetzte Agens sich in den Bestandteilen der Blutkörperchen besser löst, als im umgebenden Medium. Die das Haemolysin bindenden Bestandteile des Stromas sind Eiweiskörper, Cholesterin und Lecithin. Wie Peskind[25]) zeigte, führt die Auflösung des Cholesterins und Lecithins allein schon zur Haemolyse. Nach Untersuchungen von Walbum[34]) soll dem Pepton in den Nährböden

eine eigenartige Bedeutung in der Bildung und besonders für die Wirkung der Haemotoxine zukommen; durch Zugabe von Pepton soll die haemotoxische Wirkung der Kulturen gesteigert werden.

Bei quantitativen Versuchen mit verschiedenen Mengen des Haemolysins fanden Arrhenius und Madsen[1]), daß die Haemolyse bei Zunahme der Haemotoxinmenge ungefähr proportional dem Quadrate der Haemotoxinkonzentration wächst. Bei Überschuß von Haemotoxin ist der Grad der Haemolyse um so größer, je mehr Blut man zusetzt. Wird aber die Blutkonzentration so groß, daß keine vollständige Lösung mehr eintritt, so erhält man nach kurzem Ansteigen ein Maximum, dem beim Bakterienhaemotoxin (Tetanus) ein ganz allmählicher Abfall folgt. Nach Arrhenius und Madsen[1]) ist der Einfluß der Temperatur um so größer je geringer die Konzentration des Haemotoxins ist.

Madsen und Walbum[24]) dehnten ihre Untersuchungen auf die Haemotoxine verschiedener Bakterien aus. Dabei fanden Sie im allgemeinen das Optimum des haemolytischen Effektes bei 35°. Tetanuskulturen weichen jedoch von der Regel ab; deren Optimum liegt zwischen 20—30°. Bei höchster Temperatur wurde ein erhebliches Absinken des Effektes beobachtet, ohne daß eine Abschwächung des Haemotoxins als Ursache angenommen werden konnte.

Wie dem Schrifttum zu entnehmen ist, erstrecken sich die früheren Arbeiten über Haemolyse bei Anaerobiern vorwiegend auf die ohnehin durch die Oberflächenkultur leicht feststellbaren Gasbrand- und Pararauschbranderreger. Die neue Beobachtung von Bernard, daß die Haemolyse auch bei dem schwerer differenzierbaren Rauschbrand ein deutliches Unterscheidungsmerkmal gegenüber anderen Anaerobiern sei, veranlaßte die Anstalt dahingehende Versuche anstellen zu lassen. Es galt dabei vor allem zu ermitteln, ob das einfache, dem Tierversuch gegenüber billigere und raschere Verfahren der Haemolysereaktion auch eine sichere Feststellung des Rauschbrandes gewährleistet.

Eigene Versuche

Zum besseren Verständnis der Versuchsanordnung sollen einige Angaben über das Ausgangsmaterial, die Züchtung der Anaerobier, die Anlage der Reinkulturen, die Bereitung der Blutkörperchen und das Ansetzen des Haemolyseversuches vorausgeschickt werden.

Das Ausgangsmaterial für die Reinkulturen

In meinen Versuchen wurden insgesamt 190 Kulturstämme geprüft und zwar 99 Rauschbrand- und 91 Pararauschbrandstämme.

24 Stämme (13 Rauschbrand und 11 Pararauschbrand) waren Kulturstämme der Veterinärpolizeilichen Anstalt, die im Jahre 1933 isoliert wurden.

34 Stämme (je 17 Rauschbrand und Pararauschbrand) wurden von mir aus Trockenfleischproben isoliert, die aus Einsendungen des Jahres 1932 stammten.

132 Stämme (69 Rauschbrand und 63 Pararauschbrand) wurden aus Frischfleisch der Einsendungen des Jahres 1933 gewonnen.

Die Kulturstämme der Anstalt waren ohne weitere Überzüchtung in der Zwischenzeit dunkel bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden.

Die Züchtung aus dem Trockenfleisch geschah wie folgt: 1 Würfel von ca. 1 cm Seitenlänge wurde 20 Minuten lang in 96%igen Alkohol eingelegt. Danach wurde abgebrannt, das Fleisch im sterilen Mörser zu Pulver verrieben und mit steriler Rindfleischbouillon zu einem dünnen Brei angerührt. Durch ein ausgeglühtes Kupferdrahtsieb von 1 mm Maschenweite wurde dann der Brei geseiht. Von diesem Filtrat wurde ein mikroskopisches Präparat gefertigt zum Nachweis, ob und wieviele anaerobe Keime vorhanden waren; danach richtete sich die Menge des auf die Kulturplatten auszustreichenden Materials. Außerdem wurde dabei ermittelt, ob und in welcher Menge sich aerobe Begleitbakterien vorfinden. Bei starkem Gehalt an Aerobiern wurde das sporenhaltige Filtrat in einem Reagenzglas 10 Minuten lang im Wasserbad von 70° C unter öfterem Umschütteln erhitzt.

Das Frischfleisch wurde ähnlich vorbereitet wie das Trockenfleisch. Lediglich die Erhitzung konnte nicht immer durchgeführt werden, weil die Frischfleischfiltrate manchmal sporenfrei waren. Wollte man nicht warten, bis in dem Ausgangsmaterial Vorsporung eingetreten war, so mußte durch Anlegen von mehreren Platten mit fallenden Materialmengen das Überwuchern aerober Keime zurückgedämmt werden. Zu meinen Versuchen standen teilweise bereits fertige Frischfleischfiltrate, die im Kühlschrank aufbewahrt waren, zur Verfügung.

Im Einzelnen wurden folgende Züchtungsverfahren angewandt.

Die Züchtung nach Zeissler

Im allgemeinen wurde nach den Anleitungen von Zeissler gearbeitet mit geringen Abweichungen. Als Nährboden dient Kaninchenfleischbouillon mit Zusatz von 1% Pepton-Witte und 0,5% Kochsalz. Es wird auf den p. H.-Gehalt 7,6—7,8 nach Michaelis eingestellt. Dann erfolgt die Zufügung von 4% Agar und 2% Traubenzucker. Der verflüssigte Nährboden wird weiterhin mit frischem Hammelblut (25%) versetzt (Nährboden nach Zeissler).

Das Untersuchungsmaterial wird in der Mitte der Zeissler-Platte durch Ausstreichen der Platinöse in einem über die ganze Platte laufenden Strich aufgetragen; mit dem an der Platinöse noch haftenden Material wird dann über und gleichlaufend mit diesem mittleren Ausstrich ein zweiter und ebenso darunter ein dritter Ausstrich angelegt. Dadurch wird eine die Menge des Untersuchungsmaterials abstufende Verteilung auf der Platte erreicht.

Die Züchtung erfolgt im Maaßen'schen Apparat. Die Deckelglocke des Apparates wird mit 100 ccm Kalilauge gefüllt (15 gr KOH in 100 ccm Wasser gelöst); ein Zusatz von Pyrogallol erfolgt nicht. Der Maaßen'sche Apparat wird mittels der Pfeiffer'schen einstufigen Ölpumpe bis auf 5 mm Hg-Druck evakuiert. (Züchtungsverfahren nach Zeissler).

Die Züchtung nach Fortner

Das Fortner-Verfahren wurde enganschließend an die Originalangabe angewandt. In Verwendung kam nur die einfache Blutagarplatte, ohne Traubenzuckerbeigabe, mit Zusatz von

10% Hammelblut. Der Fortner-Agar wurde im übrigen genau so hergestellt wie der Zeissler-Agar.

Die benötigten Petrischalen waren 1 cm hoch und hatten 9 cm Bodendurchmesser. Die frisch gegossenen Blutplatten werden 1 Tag bei Zimmertemperatur mit aufliegender Deckelschale zur Trocknung belassen (Nährboden nach Fortner).

Die so getrockneten Blutagarplatten werden zur Hälfte mit einer 1—2 mm dicken Schicht einer Prodigiosuskultur beschickt. Die Prodigiosuskultur war stets frisch (2—5 Tage alt). Gewonnen wurde sie durch vorherige Aussaat auf Traubenzuckeragarplatten, die bis zur Benützung mindestens 2 Tage bei Zimmertemperatur wachsen konnten. Eine Trennung des Nährbodens durch Herausschneiden eines Agarstreifens erübrigt sich. Die andere Hälfte der Fortner-Platte wird jeweils mit dem zu untersuchenden anaeroben Material beimpft und zwar derart, daß die Platinöse mit dem Impfmaterial in einem Strich ausgezogen wird. Von diesem Ausstrich weg werden senkrechte Striche bis zur Prodigiosusgrenze hin in genügend weiten Zwischenräumen gezogen. Hierauf werden mit der vorher ausgeglühten und wieder abgekühlten Öse zum ursprünglichen Impfstrich mehrere pararelle Striche gezogen. Dadurch wird das Material in verschiedener Dichte auf der Platte verteilt (Gitterform). Eine andere Art der Beimpfung besteht darin, daß mehrere Ösen Material (je nach Keimgehalt 1—3) gleichmäßig auf den Blutagarplatten verstrichen werden (Flächenform).

Zum Verschluß der beimpten Platten wurde jeweils eine 2 mm dicke und 12 x 12 cm große, am Rande abgeschliffene Glasplatte benützt, Die innere Seite der Glasplatte wird kurz vor dem Aufsetzen abgeflammt. Zum luftdichten Abschließen dient Plastilin, das vorher stets im Brutschrank angewärmt wird. Von grundlegender Wichtigkeit ist, daß sowohl der Petrischalenrand wie die Verschlußplatte vollkommen trocken sind (Züchtungsverfahren nach Fortner).

Außerdem wurden auch Zeissler-Nährböden der Züchtungsmethode nach Fortner unterworfen.

Eine besondere Variation besteht in meinen Versuchen darin, daß auch Kulturplatten mit Pferde- und Rinderblutzusatz beigezogen wurden.

Die Züchtung von Subkulturen

Rauschbrand- und auch Pararauschbrandkolonien, die auf Fortner-Platten oder auf Zeissler-Platten unter Beiziehung der beiden Züchtungsverfahren gewonnen worden waren, wurden abgetupft und sofort ohne Zwischennährboden auf neue Fortner- bezw. Zeissler-Platten in Gitter- bezw. Flächenform ausgestrichen.

Die Anlage von Subkulturen diente der Reinzüchtung von Kolonien, wenn dies ausnahmsweise auf der Primärplatte nicht glückte, oder der einwandfreien Feststellung der Wuchsform der Kolonien, soweit dies nicht schon auf der Primärplatte möglich war. Vor allem sollte die Angewöhnung der Anaerobier auf besondere Nährböden (Pferde-, Rinderblut) durch die Anlage von Subkulturen gefördert werden.

Die Bebrütungszeit der Anaerobenkulturen betrug beim Züchtungsverfahren nach Zeissler durchwegs 36—48 Stunden, beim Züchtungsverfahren nach Fortner nicht über 24 Stunden bei Pararauschbrandkulturen bezw. bis zu 36, vereinzelt auch 48 Stunden bei Rauschbrandkulturen.

Die Gewinnung der Reinkulturen

Die Oberflächenkulturen auf den Blutagarplatten wurden mit dem binokulären Plattenmikroskop von Zeiss-Jena (Vergrößerung 15 fach) mit drehbarem Kugeltisch gemustert.

Kolonien vom Aussehen der Rauschbrand- oder Pararauschbrandkolonien wurden mit der Platinöse abgetupft und auf einem vorher gereinigten Objektträger verstrichen. Dem nichtfixiertem Präparate wurde ein kleiner Tropfen Löffler's Methylenblau zugegeben, ein Deckglas aufgelegt und durch Aufpressen von Fließpapier die außerhalb des Deckglases befindliche Flüssigkeit abgesogen.

Wenn genügend isolierte, reine Einzelkolonien vorhanden waren, wurden Deckglasabklatschpräparate gefertigt: Vorher gereinigte ganze Deckgläser oder je nach Bedarf nur Stückchen davon wurden auf die fraglichen Kolonien mittels einer Deckglaspinzette aufgelegt, leicht aufgedrückt und dann wieder ruckartig senkrecht abgehoben. Das lufttrockene Deckglaspräparat wurde in der Flamme fixiert, mit Löffler's Methylenblau gefärbt, abgespült, zwischen Fließpapier getrocknet und nach Auflegen auf einen Objektträger gemustert.

Während aus den ersten Präparaten (Nativpräparat) hauptsächlich die Form der einzelnen Bazillen zu ersehen ist, zeigen die Abklatschpräparate den Aufbau der einzelnen Kolonie.

Die Feststellung und Unterscheidung von Rauschbrand- und Pararauschbrandkolonien geschah nach den von Zeissler festgelegten Richtlinien.

War durch die Musterung festgestellt, daß eine Kolonie aus reinen Rauschbrand- oder Pararauschbranderregern bestand, so wurde eine in der Nähe der geprüften liegende Kolonie gleichen Aussehens abgestochen und entweder unmittelbar zwecks Gewinnung von Reinkulturen in Röhrchen mit Leberbouillon verbracht oder zur Anlage von Subkulturen verwendet.

Die Züchtung von Reinkulturen

Mit einem Agarheber wird eine möglichst isoliert liegende Kolonie von Rauschbrand- oder Pararauschbrandbazillen samt dem darunter liegenden Nährboden aus der Platte ausgestochen und in Leberbouillonröhrchen verbracht. Die Bebrütung dieser Kulturröhrchen erfolgt nicht anaerob, sondern aerob, weil sonst durch das Aufschäumen des Nährbodens im Vakuum Flüssigkeitsverluste entstehen und außerdem nachträgliche Verunreinigungen des Nährbodens eintreten können. Kurz vor dem Beimpfen werden die Nährbodenröhrchen zur Entfernung der Luft längere Zeit im Wasserbad zum Kochen gebracht. Nach Abkühlen auf 70—80° C werden die Röhrchen mit dem Plattenmaterial, wie oben ausgeführt, beschickt. Durch diese Vorbereitungen wird das Angehen der Kulturen bei der aeroben Bebrütung gefördert. In den meisten Fällen zeigt sich das Wachstum bereits nach 12—16, am besten aber nach 24 Stunden. Angezüchtet wurden mit Kolonien gleicher Art mindestens 2 Röhrchen, da nach den Erfahrungen der Anstalt die Kulturen nicht immer gleich gut und gleich rasch angehen. Die Weiterimpfung von Röhrchen zu Röhrchen geschah durch jeweilige Kulturentnahme mittels einer sterilen 1 ccm-Pipette. Man verschließt das Mundstück der Pipette mit der Fingerbeere und taucht sie so bis zum Boden des Reagenzröhrchens. Durch Öffnen des Mundstückes saugt die Pipette den bazillenreichen Bodensatz auf. In die neu zu beimpfenden Röhrchen gibt man je 0,1 ccm derart entnommenen Kulturmaterials.

Die Herstellung der Leberbouillon zur Züchtung der Reinkulturen entsprach der Originalangabe in der Arbeit von M. Bernard: Die Leber wird unzerschnitten einmal kurz aufgekocht, mit kaltem Wasser abgespült und von neuem mit Wasser bis zum Garwerden gekocht, dann in erbsengroße Würfel geschnitten; von diesen werden etwa 6—8 Stück in ein Reagenzglas mit 8 ccm der üblichen NaCl-Pepton-Fleischbouillon gefüllt. Diese Leberbouillonröhrchen, mit der pH-Zahl 7,4, werden an 3 aufeinanderfolgenden Tagen bei 100° eine halbe Stunde sterilisiert. Die überstehende Bouillon bleibt dabei vollständig klar.

Die Anstellung der Haemolyse-Reaktion

M. Bernard gibt von einer gut gewachsenen Leberbouillonkultur (Rauschbrand oder Pararauschbrand) in ein Reagenzglas:

0,1 ccm Kultur,

2,0 ccm physiol. Kochsalzlösung (0,85% NaCl-Gehalt),

0,2 ccm einer 3%igen Hammelblutkörperchenaufschwemmung.

Die Reagenzgläschen bleiben bei Zimmertemperatur stehen. Die höchste Zeitdauer bis zur vollständigen Haemolyse betrug 2 Stunden.

Diese Originalvorschrift wurde meinen Versuchen zugrunde gelegt wie auch die Vorschrift, nur mit gewaschenen Hammelblutkörperchen zu arbeiten.

Nach der üblichen Vorbereitung der Operationsstelle wird einem Hammel eine scharfe, sterile Hohlnadel von 2 mm Lumen in die Vena jugularis eingestochen. Das ausströmende Blut wird unmittelbar in eine sterile Stöpselflasche, die Glasperlen enthält, aufgefangen. Sofort nach Beendigung der Blutentnahme wird die Flasche mindestens 15 Minuten lang ununterbrochen stark geschüttelt, um das Blut zu defibrinieren. Da nach Laubenheimer[22]) auch die Art der Defibrinierung, die Dauer und Intensität des Schüttelns von Einfluß auf den Ablauf der Haemolyse ist, wurde auf gleichmäßiges und festes Schütteln während 15 Minuten besonders geachtet. Zur Abscheidung des Schaumes läßt man das Blut in der Flasche $^1/_4$ Stunde stehen. Dann gießt man es in Zentrifugenbecher und zentrifugiert es $^1/_4$ Stunde (3500 Umdrehungen je Minute). Abgießen bezw. abpipettieren des überstehenden Serums, Ersetzen der gleichen Menge durch NaCl-Brunnenwasser und erneutes

10 Minuten langes Zentrifugieren. Nach dem dritten Zentrifugieren werden nach Entfernen der überstehenden Flüssigkeit die roten Blutkörperchen bis zum Gebrauch im Kühlschrank bei 0—4° C aufbewahrt.

Von den Reinkulturen (Leberbouillon) wurde lediglich die überstehende fast klare Flüssigkeit für die Versuche verwendet. Sie wurde mit graduierten 1 ccm Pipetten ohne Aufrühren des Bodensatzes aus den Kulturröhrchen aufgesogen. Es wurde auch die Menge des in der Kulturflüssigkeit entwickelten Schaumes, also die größere oder geringere Intensität der Schaumbildung festgestellt. Erschienen Kulturröhrchen durch Wachstum von Aerobiern verunreinigt, so wurde ihr Inhalt auf Agarplatten geprüft.

Als Reagenzgläschen dienten dünnwandige, 12—13 cm lange Glasröhrchen, die einen ungefähren Durchmesser von 7—8 mm aufweisen und in Stellagen aufgestellt wurden. Durchschnittlich wurde 2 Stunden bei Zimmertemperatur beobachtet.

Soweit in den nachfolgenden Versuchen nichts anderes bemerkt ist, wurde nach der angegebenen Originalmethode von M. Bernard gearbeitet. Änderungen in der Versuchsanordnung sind in den einzelnen Versuchen niedergelegt.

Die einzelnen Versuche wurden jeweils stehts mit einer größeren Zahl von Kulturstämmen angesetzt. Dies bot den Vorteil, das Verhalten der Rauschbrandstämme im Gegensatz zu Pararauschbrandstämmen unter großen Gesichtspunkten herauszuschälen. Das abweichende Verhalten einzelner Stämme, bedingt durch schlechtes Wachstum oder Verunreinigung der Reinkulturen, charakterisierte sich dabei ohne weiteres als Ausnahme und blieb deshalb vielfach in der Besprechung der Versuchsergebnisse ohne Erwähnung.

Die Versuche

Vorversuch

Es galt, das Verfahren, wie es von Bernard angegeben wurde, in engster Anlehnung an die Originalarbeit kennen zu lernen.

Kulturstämme: 13 Rauschbrand- und 11 Pararauschbrandstämme, isoliert aus Frischfleischfiltraten nach der Zeissler-Methode.

Die Reinkulturen (Leberbouillon) wurden 24 Stunden bebrütet. Je Stamm wurden 2 Röhrchen angezüchtet; zum Versuch wurde stets das besser gewachsene beigezogen.

Blutkörperchen vom Hammel, vor 2 Tagen gewaschen und im Kühlraum aufbewahrt.

Kontrollen: Unangezüchtete Leberbouillon, die ebenfalls 24 Stunden bei 37° gehalten wurde.

Außerdem wurde eine Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung angesetzt.

Ergebnis: 12 von den Rauschbrandstämmen bewirkten bereits nach 10 Minuten eine vollkommene Haemolyse der Hammelblutkörperchen; nur 1 Rauschbrandstamm benötigte 30 Minuten.

9 Pararauschbrandstämme riefen bis zum Ende der Beobachtung (2 Stunden) keine Haemolyse hervor. Mit 1 Stamm trat gegen Ablauf der 2. Stunde eine ganz leichte Haemolyse, mit einem 2. Stamm eine etwas stärkere, jedoch auch nur unvollständige Haemolyse ein.

In den Kontrollröhrchen (NaCl-Nährboden-Kontrolle) zeigte sich keine Haemolyse.

Im allgemeinen scheinen Zusammenhänge zwischen dem Wachstum der Bakterienstämme und dem zeitlichen Eintritt der vollkommenen Haemolyse zu bestehen. Sehr gut und gut gewachsene Rauschbrandkulturen lösten bereits nach 10 Minnten vollständig. Der Rauschbrandstamm, der erst nach 30 Minuten vollständige Haemolyse bewirkte, wies auch geringeres Wachstum auf.

Im Kulturröhrchen mit starker Gasbildung waren teilweise nicht mehr oder sogar weniger Haemolysine nachweisbar, als im Kulturröhrchen mit geringerer Gasbildung. Danach erweckt es den Anschein, daß die Gasbildung keinen absoluten Gradmesser für das Wachstum der Kultur bezw. die Haemolysinbildung abgibt.

Zusammenfassend bestätigt der Vorversuch, daß sich die Hammelblutkörperchen-Reaktion im Reagenzglas zur Unterscheidung von Rauschbrand- und Pararauschbrandstämmen eignet.

Es wurden weiterhin Versuche angestellt mit verschiedenen auf die Blutkörperchen bezüglichen Variationen.

A. Variationen bezüglich der Blutkörperchen

1. Blutkörperchen verschiedener Tierarten

Es galt festzustellen, ob die Reaktion abhängig ist von der Tierart, welche die roten Blutkörperchen lieferte bezw. ob und welche Unterschiede sich dabei herausstellten.

Außer Blutkörperchen von Hammel wurden auch solche vom Pferd, Rind, Kaninchen und Meerschweinchen genommen. Die Blutentnahme erfolgte bei den Großtieren in gleicher Weise wie beim Hammel. Das Blut vom Kaninchen und Meerschweinchen wurde nach Betäubung und nach Durchtrennung der Halsgefäße (Kaninchen) bezw. der großen Gefäße unter dem Schulterblatt (Meerschweinchen) aufgefangen. Die Blutkörperchen wurden 2 Tage im Kühlschrank bis zur Anstellung der Reaktion aufgehoben.

Kulturstämme: 13 Rauschbrand- und 11 Pararauschbrandstämme aus Frischfleisch nach dem Zeissler-Verfahren isoliert. Je Kulturstamm wurden 2 Leberbouillonröhrchen angezüchtet.

Im übrigen war die Versuchsanordnung die Gleiche wie im Vorversuch.

Ergebnis: Verhalten der Rauschbrandstämme

Die Blutkörperchen vom Hammel wurden von 12 Stämmen innerhalb 10 Minuten, von 1 Stamm innerhalb 30 Minuten vollständig gelöst. Letzterer Stamm war schwach gewachsen. Bei Blutkörperchen vom Rind trat dies mit 3 Stämmen bereits innerhalb 5 Minuten, bei den übrigen 10 Stämmen innerhalb 10 Minuten ein. Die Reaktion mit Rinderblut war durchwegs sinnfälliger. Mit Abstand folgte weiterhin das Kaninchenblut. Der vollständige Ablauf der Haemolyse forderte mindestens 20 Minuten (4 Stämmme) und beanspruchte bis zu 60 Minuten (4 Stämme). Mit Blutkörperchen vom Meerschweinchen trat vollständige Haemolyse überhaupt erst nach 2 Stunden ein und auch hier nur bei 5 Kulturstämmen. Pferdeblut zeigte nach Ablauf von 2 Stunden nur teilweise sehr schwache Haemolyse und das nur mit 8 Stämmen.

Verhalten der Pararauschbrandstämme

Mit Hammelblut zeigten nur 2 Stämme schwache Haemolyse am Ende der Beobachtungszeit. Mit Pferdeblut war dies ebenfalls bei 3 Stämmen, mit Rinderblut bei 5 Stämmen der Fall.

Mit Kaninchen- und Meerschweinchenblutkörperchen trat die Haemolyse bereits nach 10 bezw. 5 Minuten ein und war bis zu 90 bezw. 30 Minuten bereits vollständig. Keine Haemolyse ergaben mit Kaninchenblutkörperchen nur 3 Stämme, mit Meerschweinchenblut nur 1 Stamm.

In den Kontrollen (Nährboden- und Kochsalzlösung mit den 5 verschiedenen Blutarten) zeigte sich keine Haemolyse.

Der Versuch zeigt, daß sich Blutkörperchen vom Pferd, Kaninchen und Meerschweinchen nicht eignen zur Anstellung der Reaktion. Die Haemolysinwirkung der Rauschbrandkulturen auf Pferdeblutkörperchen ist zu gering; es ergeben sich damit keine Unterschiede gegenüber Pararauschbrandstämmen. Blutkörperchen vom Kaninchen und Meerschweinchen werden fast im gleichen Grade von Rauschbrand- wie auch von Pararauschbrandstämmen gelöst. Blutkörperchen vom Rind sind den Hammelblutkörperchen in ihrem Verhalten gegenüber Rauschbrand- und Pararauschbrandstämmen ebenbürtig, wenn die Beobachtungszeit nicht über 90 Minuten ausgedehnt wird.

2. Blutkörperchen verschiedener Tiere gleicher Arten

Es galt festzustellen, ob in dem Verhalten der Blutkörperchen gegenüber den Haemolysinen der Kulturstämme individuelle Unterschiede bestehen. Bei gleicher Versuchsanordnung wie im vorhergehenden Versuch wurden die Blutkörperchen von je 4 verschiedenen Hammeln, Rindern, Pferden, Kaninchen und Meerschweinchen geprüft.

Die Bebrütungsdauer der Kulturen war unterschiedlich: 48 Stunden (mit Hammelblutkörperchen), 72 Stunden (mit Meerschweinchen- und Kaninchenblutkörperchen) und 96 Stunden (mit Rinder- und Pferdeblutkörperchen). Die Blutkörperchen vom Rind, Pferd, Meerschweinchen und Kaninchen wurden sofort nach dem Waschen, die Hammelblutkörperchen nach 2 tägiger Aufbewahrung im Kühlraum verwendet.

Ergebnis: Wegen der Unterschiede in der Versuchsanordnung soll von einem Vergleich der Ergebnisse bezüglich der einzelnen Tierarten hier abgesehen werden. Es stehen also nur die einzelnen zu einer Art gehörigen Tiere untereinander in Vergleich.

Soweit Unterschiede im Verhalten gegenüber den einzelnen Kulturstämmen überhaupt festzustellen sind, sind diese äußerst geringfügig. Sie betreffen nur leichte Schwankungen in der Intensität und im zeitlichen Eintritt der Haemolyse. Im allgemeinen verhalten sich die Blutkörperchen der verschiedenen Tiere einer Art gegenüber dem einen oder anderen Kulturstamm nahezu gleich. Unterschiede traten auch hier, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des vorhergehenden Versuches, nur hinsichtlich der haemolysierenden Wirkung der Kulturstämme selbst in Erscheinung.

3. Blutkörperchen verschiedener Tierarten in verschiedenen Konzentrationen

Es galt festzustellen, ob und welche Rolle die Konzentration der Blutkörperchen im Ablauf der Reaktion spielt. Ferner sollte geprüft werden, ob nicht die Blutkörperchen anderer Tierarten bei Auswahl einer optimalen Konzentration das Gleiche zu leisten vermögen wie Hammelblutkörperchen in 3%iger Aufschwemmung.

Kulturstämme: 5 Rauschbrand- und 5 Pararauschbrandstämme nach dem Zeissler-Verfahren aus Frischfleisch isoliert. Die Reinkulturen (Leberbouillon) wurden 48 Stunden bebrütet.

Die Blutkörperchen stammten vom Hammel, Rind, Pferd, Kaninchen und Meerschweinchen. Sie waren bis zur Verwendung 2 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. In Abweichung zu den früheren Versuchen wurden die Blutkörperchen der einzelnen Tierarten unmittelbar mit der in der Reaktion benötigten Menge der Kochsalzlösung zusammengebracht und mit dieser in die Röhrchen pipettiert. Es wurden also jedem Röhrchen 2 ccm folgender Blutkörperchenkonzentration zugesetzt: 0,1%, 0,3%, 0,5%, 1%, 3% und 5%ige Blutkörperchenaufschwemmung. Die hier als 0,3%ige bezeichnete Blutkörperchenaufschwemmung entspricht demnach der in den vorherigen Versuchen verwendeten Blutkörperchenkonzentration mit der kleinen Abweichung, daß dort die betreffende absolute Blutkörperchenmenge in 2,2 ccm Flüssigkeit (2,0 ccm Kochsalzlösung + 0,2 ccm Blutkörperchenaufschwemmung), hier aber in nur 2,0 ccm Gesamtflüssigkeit suspendiert war. Das Pipettieren der roten Blutkörperchen in einer größeren Flüssigkeitsmenge gewährleistete größere Sicherheit und Gleichmäßigkeit des Zusatzes. Die zugesetzte Menge der Kulturflüssigkeit betrug wie immer 0,1 ccm.

Kontrollen: nicht beimpfte, aber bebrütete Leberbouillon bezw. Kochsalzlösung mit jeder Blutkörperchenart.

Ergebnis: Pferde-, Kaninchen- und Meerschweinchenblut versagten in jeder Konzentration, eine Unterscheidung von Rauschbrand- und Pararauschbrandstämmen war auch durch Variation der Blutkörperchenmengen nicht möglich.

Die Ergebnisse mit Hammelblut waren bei Verwendung der 0,3% igen — also der vorschriftsmäßigen — Lösung am besten: Sämtliche Rauschbrandstämme riefen vollständige Lösung bis spätestens zur 60. Minute hervor, die Pararauschbrandstämme lösten nicht innerhalb 2 Stunden.

Gleich gut, fast noch besser, waren die Ergebnisse mit Rinderblut bei der gleichen Konzentration. Die Haemolyse mit Rauschbrandstämmen verlief hier sogar rascher als beim Hammelblut: sie war spätestens nach 20 Minuten vollständig.

Höhere oder niedere Konzentrationen von Hammelblutkörperchen bewährten sich nicht. Mit niederen Konzentrationen trat die Haemolyse (bei Rauschbrandstämmen) ziemlich rasch ein, doch war das Ergebnis wegen der starken Verdünnung des Blutes schwer ablesbar. Bei den hohen Konzentrationen verlief die Blutkörperchenlösung sehr langsam, so daß innerhalb 2 Stunden vielfach die Reaktion noch nicht vollständig abgeschlossen war, zu einem Zeitpunkt, in dem andererseits bei manchen Pararauschbrandstämmen bereits Haemolyse einsetzt.

4. Die Haltbarkeit der Blutkörperchen

Es galt festzustellen, wie lange gewaschene Blutkörperchen im Kühlraum (2—4°) aufbewahrt werden können, ohne für den Versuch unbrauchbar zu werden. Die Frage interessierte im Hinblick auf die Vereinfachung der Versuchsanstellung.

Kulturstämme: 5 Rauschbrand- und 5 Pararauschbrandstämme.

Bebrütungsdauer der Reinkulturen: 24 Stunden.

Blutkörperchen von Hammel und Rind, vorschriftsmäßig gewaschen, wurden gleich danach sowie nach 11, 17, 24, 32, 37 und 44 tägiger Aufbewahrung im Kühlschrank in den Versuch genommen.

Kontrollen: Kochsalzlösung und unbeimpfte, aber bebrütete Leberbouillon.

Ergebnis: In den Kontrollröhrchen mit Kochsalzlösung und Bouillon zeigten die längere Zeit aufbewahrten Blutkörperchen — im Gegensatz zu den frischgewaschenen Blutkörperchen — geringere oder stärkere Selbstlösung. In den Kontrollröhrchen war schon Lösung festzustellen bei Hammelblutkörperchen, die 11 Tage aufbewahrt worden waren, bei den Rinderblutkörperchen bei einer Aufbewahrung von 17 Tagen. Am stärksten trat die Lösung zu Tage bei den seit 44 Tagen aufbewahrten Hammelblutkörperchen.

Danach kann eine Aufbewahrung von Blutkörperchen bis zu 10 Tagen nicht empfohlen werden. Bis zu welchem kürzeren Zeitpunkte die Blutkörperchen ohne Schaden im Kühlraum gehalten werden können, ist durch diesen Versuch nicht restlos geklärt. Mit der Feststellung, daß die Aufbewahrung schädigend auf die Blutkörperchen einwirkt, ergibt sich indessen ohne weiteres die Notwendigkeit, mit möglichst frisch gewonnenen und gewaschenen Blutkörperchen zu arbeiten, um Fehlergebnisse möglichst auszuschalten.

Im übrigen hat der Versuch mit den frischgewaschenen Blutkörperchen wieder ergeben, daß die Rinderblutkörperchen den Hammelblutkörperchen bezüglich des zeitlichen Eintritts der Haemolyse in nichts nachstehen, in der Intensität der Lösung sie sogar teilweise übertreffen.

B. Variationen bezüglich der Kulturen

1. Wirkung der Kulturflüssigkeit in verschiedenen Mengen

Es galt festzustellen, ob die in den Versuchen vorgeschriebene Menge von Kulturflüssigkeit (0,1 ccm) ohne Schaden für die Reaktion variiert werden kann bezw. welche Änderungen dadurch die Haemolyse erfährt.

Kulturstämme: 13 Rauschbrand- und 11 Pararauschbrandstämme, isoliert aus Frischfleisch nach dem Zeissler-Verfahren; in Reinkultur (Leberbouillon) 48 Stunden gezüchtet. Die Kulturmenge wurde im Reaktionsversuch variiert: 0,05 ccm, 0,1 ccm, 0,2 ccm, 0,3 ccm und 0,5 ccm je Röhrchen.

Blutkörperchen von Hammel und Rind, 2 Tage im Kühlschrank aufbewahrt in vorschriftsmäßiger Konzentration und Menge.

Kochsalz- und Leberbouillon-Kontrollen mit jeder Art von Blutkörperchen.

Beobachtungszeit: 2 Stunden.

Ergebnis: Im Vergleich zu den Röhrchen, denen die vorschriftsmäßige Kulturmenge (0,1 ccm) zugefügt war, trat die Lösung (Rauschbrand) bei Zusatz von nur 0,05 ccm später bezw. innerhalb 2 Stunden nur unvollständig ein. In dieser kleinsten Menge trat eine Lösung mit der Kulturflüssigkeit der Pararauschbrandstämme nicht ein.

Mit Steigerung der Kulturmengen wurde der Ablauf der Haemolyse (Rauschbrand) beschleunigt. Im zunehmenden Maße trat gleichzeitig damit aber auch Haemolyse bei Pararauschbrandstämmen ein. In der Kulturmenge von 0,1 ccm löste nur 1 Pararauschbrandstamm schwach zwischen 60 und 120 Minuten. Mit 0,2 ccm Kulturmenge rief dieser Stamm schon stärkere Reaktionen, mit der 30. Minute beginnend, hervor; außerdem lösten hier nach 2 Stunden eine Anzahl weiterer Pararauschbrandstämme geringgradig. Bei Verwendung noch größerer Kulturmengen beobachtete man diese Erscheinungen in der Gruppe der Pararauschbrandstämme immer häufiger und intensiver.

Danach ist die vorschriftsmäßige Menge von 0,1 ccm Kulturflüssigkeit gerade dazu angetan, die bestmöglichste haemolysierende Wirkung mit Rauschbrandkulturen auszuüben. Andererseits tritt bei dieser Menge von Pararauschbrand-Kulturflüssigkeit — wenn überhaupt — eine Haemolyse so spät und so schwach ein, daß Verwechslungen mit Rauschbrandstämmen ausgeschlossen sind.

Auch in diesem Versuch haben sich die Blutkörperchen vom Rind im allgemeinen ebenso gut bewährt wie die vom Hammel.

2. Die Bebrütungszeit der Reinkulturen (Leberbouillon)

Bei Beobachtung der vorhergehenden Versuche konnte die Feststellung gemacht werden, daß die verschiedenen Rauschbrandstämme unterschiedlich auf die Blutkörperchen einwirkten. Um eine besondere — schwächer oder stärker haemolysierende — Eigenschaft des Rauschbrandstammes selbst handelte es sich dabei nicht, weil der gleiche Stamm in verschiedenen Versuchen verschiedene Wirksamkeit zeigte. Es liegt der Gedanke nahe, den Grund für diese Verschiedenheit im unterschiedlichen Wachstum der Stämme zu

suchen. Wie schon früher angeführt, wollte das stärkere oder schwächere Wachstum der Kulturen aus der Gas-(Schaum)bildung in den Kulturröhrchen erkannt werden. In vielen Fällen ging der Grad der Gasbildung mit dem Grad der haemolysierenden Wirkung der Kulturflüssigkeiten parallel. In anderen Röhrchen besaß aber die Kulturflüssigkeit trotz mangelnder Gasbildung starke haemolysierende Eigenschaften. Andernteils wurde auch beobachtet, daß die unterschiedlichen Bebrütungszeiten der Kulturröhrchen nicht allein ausschlaggebend waren für den Ausfall der Reaktion.

Es galt nun festzustellen, ob und welchen Einfluß die Dauer der Bebrütungszeit auf die Bildung der Haemolysine ausübt.

Kulturstämme: Je 5 Rauschbrand- und Pararauschbrandstämme isoliert aus Frischfleisch im Zeissler-Verfahren als Reinkulturen 1, 2 und 4 Tage bebrütet. Dabei wurde nach 1 tägiger Bebrütung aus den einzelnen Röhrchen ein Teil der Kulturflüssigkeit abgehoben, im Kühlschrank verwahrt und zur Versuchsanstellung am 2. bezw. 4. Tage beigezogen.

Blutkörperchen von Hammel und Rind 1 bezw. 4 Tage im Kühlschrank aufbewahrt.

Kontrollen: Kochsalzlösung- und Nährbodenkontrollen mit beiden Blutarten.

Ergebnis: Die 24 Stunden bebrütete, vorher abgegossene Kulturflüssigkeit ergab mit sämtlichen Rauschbrandstämmen nach kurzer Beobachtungszeit vollständige Haemolyse. In der während 2 Tagen bebrüteten Kulturflüssigkeit war die Haemolyse bei 3 Rauschbrandstämmen bereits stark hinausgezögert, bei 2 Rauschbrandstämmen fiel sie vollkommen aus. Nach 4 tägiger Bebrütung hat die Kulturflüssigkeit ihre haemolysierende Wirkung vollständig verloren. Die Aufbewahrung der 24 Stunden bebrüteten und dann abgegossenen Kulturflüssigkeit im Kühlraum schädigte die Haemolysine nicht.

Die Blutkörperchen von Hammel und Rind verhielten sich dabei im allgemeinen gleich.

Der Versuch zeigt, daß ein zu langes Verweilen der Rauschbrandreinkulturen im Brutschrank deren haemolysierende Wirkung vermindert bezw. zerstört.

3. Einfluß der Temperatur auf die Kulturflüssigkeit

Die Ergebnisse des vorhergehenden Versuches können zu der Annahme führen, daß die Beeinträchtigung der Haemolysine in länger bebrüteten Rauschbrandkulturen auf die Einwirkung der Brutschranktemperatur zurückzuführen ist.

Es galt festzustellen, ob hohe oder niedere Temperaturen bei kürzerer oder längerer Einwirkungszeit die Haemolysine der Rauschbrandkulturen schädigen.

Kulturstämme: 17 Rauschbrand- und 15 Pararauschbrandstämme aus Frischfleisch im Zeissler-Verfahren isoliert, in Reinkulturen (Leberbouillon) 24 Stunden bebrütet. Danach wurde die überstehende Flüssigkeit der einzelnen Kulturröhrchen abgezogen, in gleiche Teile geteilt und im Brutschrank oder Kühlschrank verschieden lange Zeit verwahrt. Die Kulturflüssigkeiten von 13 Rauschbrand- und 11 Pararauschbrandstämmen wurden nach 6 tägigem Aufenthalt, die Kulturflüssigkeiten von je 4 Rauschbrand- und Pararauschbrandstämmen nach 14 tägigem Aufenthalt im Brut- bezw. Kühlschrank geprüft. Außerdem wurden je 5 Rauschbrand- und Pararauschbrandkulturen mit der noch darin verbliebenen geringen Kulturflüssigkeit weitere 8 Tage im Brutschrank belassen, danach mit der Flüssigkeit die Reaktion angesetzt, in die Kulturröhrchen erneut sterile Leberbouillon eingebracht, weitere 24 Stunden bebrütet und dann auch diese Kulturflüssigkeit im Haemolyseversuch geprüft.

Blutkörperchen vom Rind und Hammel.

Kontrollen: Kochsalzlösung und nicht beimpfte, aber bebrütete Leberbouillon.

Ergebnis: Der Aufenthalt der abgegossenen Kulturflüssigkeit im Brut- und im Kühlschrank hat die Haemolyse stark geschädigt. Dabei trat die Schädigung bei Kühlschranktemperatur stärker ein als bei Brutschranktemperatur.

Von den 13 während 6 Tage im Kühlschrank aufbewahrten Rauschbrandkulturflüssigkeiten bewirkten nur noch 3 und von diesen 2 auch nur noch teilweise Haemolyse; von den 4 während 14 Tagen kühl aufbewahrten Rauschbrandstämmen zeigten nur noch 2 ganz geringe Haemolyse nach 2 stündiger Beobachtung.

Nach 6 tägiger Aufbewahrung im Brutschrank waren noch bei 4 (von 13) Rauschbrandkulturen Haemolysine nachzuweisen; nach

14 tägigem Aufenthalt bei 2 (von 4). Soweit Haemolyse hier noch beobachtet wurde, setzte sie verhältnismäßig stark und rasch ein.

Die 5 nach Abgießen von Kulturflüssigkeit im Brutschrank belassenen Rauschbrandkulturen beherbergten keine Haemolysine mehr.

In der darauf zugefügten und während weiteren 24 Stunden bebrüteten Kulturflüssigkeit, waren dagegen Haemolysine in so großer Menge vorhanden, daß innerhalb 10 Minuten vollkommene Lösung der Blutkörperchen eintrat. Allerdings war dasselbe auch bei 4 Pararauschbrandstämmen der Fall, wobei die Haemolyse z. T. genau so rasch und intensiv einsetzte wie bei den Rauschbrandstämmen.

Der Versuch lehrt, daß durch länger dauernde Einwirkung von höheren, besonders aber von niederen Temperaturen die Haemolysine in der abgegossenen Kulturflüssigkeit geschädigt werden. Noch rascher tritt die Zerstörung der Haemolysine ein, wenn die Kulturflüssigkeit zusammen mit den Leberstückchen im Brutschrank gehalten wird. Durch Zusatz frischer Bouillon zu alten, nicht mehr haemolysierenden Kulturen und Bebrütung während 24 Stunden können wieder neue Haemolysine erzeugt werden.

Es entstanden indessen dabei auch in den Pararauschbrandkulturen Haemolysine, weshalb mit derartig vorbereiteten Kulturflüssigkeiten eine Unterscheidung von Rauschbrand- und Pararauschbrandstämmen nicht mehr möglich ist.

4. Einfluß der Temperatur auf die Kulturen

Nach dem Ausfall des vorhergehenden Versuchs galt es festzustellen, wie sich der Einfluß von höheren Temperaturen auf gewachsene Kulturen geltend macht.

Kulturstämme: 13 Rauschbrand- und 11 Pararauschbrandstämme aus Frischfleisch nach dem Zeissler-Verfahren isoliert, in Reinkultur (Leberbouillon) 1 Tag gezüchtet. Die einzelnen Kulturröhrchen wurden ohne weitere Behandlung und nach $^1/_2$ stündigem Erhitzen auf 56° im Wasserbad unter öfterem Umschütteln geprüft.

Blutkörperchen von Hammel und Rind.

Kontrollen: Kochsalzlösung und unbeimpfte, erhitzte und unerhitzte Leberbouillon.

Ergebnis: Das $^1/_2$ stündige Erhitzen der Kulturen auf 56° schädigte die Haemolysine so, daß einige der Rauschbrandkulturen ihre ursprüngliche haemolysierende Wirkung überhaupt ganz, andere teilweise verloren. Bezüglich der Pararauschbrandkulturen, die in unerhitztem Zustand Späthaemolysen zeigten, wurde die gleiche Beobachtung gemacht.

In den Kontrollröhrchen trat keine Lösung der Blutkörperchen ein. Die Blutkörperchen vom Rind wurden im allgemeinen leichter gelöst als die vom Hammel.

Der Versuch lehrt, daß schon ein verhältnismäßig kurzes ($^1/_2$ stündiges) Erhitzen der Kulturen auf 56° die Haemolysine stark schwächt.

5. Einfluß der Nährbodenfolge in der Züchtung

Übereinstimmend konnte in sämtlichen bis jetzt durchgeführten Versuchen die Beobachtung gemacht worden, daß die in Leberbouillon gezüchteten Reinkulturen der Rauschbrand- und Pararauschbrandstämme, wenn sie gutes Wachstum zeigten und weiter nicht vorbehandelt wurden, sich scharf unterscheiden:

Rauschbrandstämme zeigten gegenüber Hammel- und auch Rinderblutkörperchen eine rasch und stark einsetzende Haemolyse; bei den Pararauschbrandstämmen wurde diese ganz vermißt oder trat nur unvollständig und sehr spät ein. In allen diesen Versuchen hat es sich um Kulturstämme gehandelt, die unmittelbar vor Anzüchtung in Leberbouillon über Blutplatten (im Zeisslerverfahren) passiert worden waren. Im Gegensatz zum Verhalten derart gezüchteter Stämme stand das Verhalten von Stämmen, die nicht unmittelbar von der Blutplatte in Leberbouillon verbracht worden waren. In dem Versuch B 3 „Einfluß der Temperatur auf die Kulturflüssigkeit" war nämlich festgestellt worden, daß Kulturstämme, die nach längerer Aufbewahrung durch Einbringen von frischer Bouillon zu neuem Wachstum angeregt worden waren, ohne Unterschied, ob es sich um Rauschbrand- oder Pararauschbrandstämme handelte, gleichmäßig Haemolysine gebildet hatten.

Es galt festzustellen, ob diese eine Beobachtung in weiteren Versuchen bestätigt werden konnte.

Kulturstämme: 13 Rauschbbrand- und 11 Pararauschbrandstämme, die wiederholt in früheren Versuchen nach unmittelbarem Passieren

von Blutplatten als Reinkulturen in Leberbouillon die typischen Unterscheidungsmerkmale von Rauschbrand- und Pararauschbrandkulturen im Haemolyseversuch gezeigt hatten. In diesem Versuch wurden die Stämme wie folgt gezüchtet: Die alten, seit vielen Wochen bei Zimmertemperatur aufbewahrten Stämme wurden durch Einbringen von steriler Leberbouillon und 24 stündiges Bebrüten bei 37° zu neuem Wachstum gebracht. Außerdem wurden die gleichen alten Stämme im Zeissler-Verfahren über Blutplatten passiert, Kolonien von der Platte in Leberbouillon überzüchtet und nach 48 stündigem Wachstum von diesen Leberbouillonkulturen wieder neue Leberbouillonkulturen angelegt. Erst letztere Kulturen wurden nach 24 stündigem Wachstum der Haemolyseprüfung unterstellt. Blutkörperchen von Hammel und Rind.

Kontrollen: Kochsalzlösung und nicht beimpfte Leberbouillon.

Ergebnis: Es bestätigte sich die schon obengemachte Beobachtung, daß mit Auffrischung alter Stämme durch Leberbouillon Pararauschbrandstämme in viel stärkerem Maße Haemolysine bilden. Ein Pararauschbrandstamm vermochte bereits nach 5 Minuten sämtliche Hammelblutkörperchen zu lösen, ein Verhalten, das sonst nur Rauschbrandstämme zeigten. Auch bei anderen Pararauschbrandstämmen trat die Haemolyse gegenüber Hammelblutkörperchen stärker und früher ein als sonst.

Ähnlich war das Verhalten von 2 Pararauschbrandstämmen, die von Leberbouillon in frische Leberbouillon gezüchtet waren. Sie bewirkten vollständige Haemolyse der Hammelblutkörperchen bereits nach 15, spätestens nach 90 Minuten.

Das Verhalten der Rinderblutkörperchen war im allgemeinen ähnlich dem der Hammelblutkörperchen.

In den Kontrollröhrchen trat keine Haemolyse ein.

Der Versuch zeigt, daß Rauschbrand- und Pararauschbrandkulturen in ihrem typischen Verhalten gegenüber Blutkörperchen nur dann unterschieden werden können, wenn sie kurz vorher, d. h. unmittelbar vor Anzüchtung der Reinkulturen (Leberbouillon) über Blutplatten passiert werden.

6. Die Plattenzüchtungsverfahren

Mit der Beobachtung, daß eine vorherige Passage über Blutplatten notwendig ist, um einwandfreie Haemolysinreaktion zu

erzielen, drängte sich die Frage auf, ob es dabei von ausschlaggebender Bedeutung ist, ob die Züchtung bezw. Isolierung der Kolonien nach dem Zeissler- oder Fortner-Verfahren durchgeführt wird. Der Unterschied in den beiden Verfahren beruht, was hier nochmals hervorgehoben werden soll, im folgendem: Der Zeissler-Nährboden enthält 25% Hammelblut und 2% Traubenzucker; der Fortner-Nährboden enthält nur 10% Hammelblut und keinen Traubenzucker. Die anaeroben Verhältnisse werden im Zeissler-Verfahren durch Evakuieren der Luft, im Fortner-Verfahren durch Symbiose mit Prodigiosuskulturen geschaffen. Die Bebrütungszeit betrug im Zeissler-Verfahren 48 Stunden, im Fortner-Verfahren 24 Stunden (Pararauschbrand) bis 36 Stunden (Rauschbrand).

Kulturstämme: 13 Rauschbrand- und 11 Pararauschbrandstämme.

Sämtliche Stämme wurden nach 3 verschiedenen Methoden variiert: Im Zeissler-Verfahren, im Fortner-Verfahren und in einer Kombination der beiden Verfahren, wobei Zeissler-Nährböden nach dem Fortner-Verfahren gehalten wurden. Von den Platten weg wurden gut gewachsene Kolonien in Leberbouillon überzüchtet und 48 Stunden bebrütet.

Blutkörperchen vom Hammel, Rind und Pferd.

Kontrollen: Physiologische Kochsalzlösung und Leberbouillon mit den 3 Blutkörperchenarten.

Ergebnis: In Übereinstimmung mit den Beobachtungen der Anstalt ergab sich, daß die Isolierung der Kolonien am leichtesten im Fortner-Verfahren gelingt. Die Züchtung auf Zeissler-Nährböden ließ die Verunreinigungskeime rascher wuchern. Es soll dahingestellt bleiben, ob der Grund hiefür in dem stärkeren Blutgehalt oder im Gehalt an Traubenzucker oder in beiden Faktoren zu suchen ist. Im Zusammenhang damit erwiesen sich bei späterer Prüfung auch viel mehr Bouillonröhrchen verunreinigt, die von Zeissler-Platten aus angezüchtet waren. Es ließ sich eben nicht vermeiden, daß trotz sorgfältigster Prüfung unter der Lupe und im Mikroskop Kolonien abgestochen wurden, die auf kleinsten Kolonien von Aerobiern aufsaßen.

Die Blutkörperchen vom Pferd erwiesen sich auch in diesem Versuch als unbrauchbar. Die Blutkörperchen vom Rind waren ebenso brauchbar als die vom Hammel; vielfach trat bei

Rauschbrandkulturen die Haemolyse mit Rinderblutkörperchen eher ein.

Unterschiede in der Wirkung der Kulturen je nach ihrer Herkunft von der Zeissler- oder Fortner-Platte und je nach dem Züchtungsverfahren stellten sich nicht heraus. Übereinstimmend trat mit Pararauschbrandkulturen keine Haemolyse ein; die Rauschbrandkulturen lösten im allgemeinen gut. Schlecht gewachsene sowie unreine Rauschbrandkulturen versagten oder riefen Verzögerung der Haemolyse hervor. Aus letzterem Grunde versagten deshalb häufiger Rauschbrandkulturen die von Zeissler-Platten stammten.

7. Zeissler- und Fortnerplatten hergestellt mit Pferde- und Rinderblut

Nach den vorhergehenden Versuchen steht fest, daß das Passieren der Rauschbrand- und Pararauschbrandkulturen über Blutplatten notwendig ist. Andernfalls treten die Unterschiede in der Haemolysewirkung zwischen Rauschbrand- und Pararauschbrandstämmen nicht zu Tage, weil dann auch Pararauschbrandstämme haemolysierende Eigenschaften gleichen oder ähnlichen Grades wie Rauschbrandstämme aufweisen. Unter diesem Gesichtspunkt sollte nun festgestellt werden, ob durch Änderung der den Platten zugefügten Blutart die haemolysierende Eigenschaft der Stämme beeinflußt wird.

Kulturstämme: 5 Rauschbrand- und 5 Pararauschbrandstämme isoliert aus Frischfleisch.

Zur Herstellung der Blutplatten, über die die Stämme passiert wurden, diente statt Hammelblut, Rinder- und Pferdeblut. Im übrigen wurde nach dem Fortner- und Zeissler-Verfahren gezüchtet und außerdem noch mit der Variation, daß die nach dem Zeissler-Verfahren hergestellten Platten im Fortner-Verfahren bebrütet wurden. Um eine stärkere Angewöhnung des Wachstums an die unterschiedlichen Blutarten in den Platten zu erzielen, wurden außerdem von den Primärplatten auf gleichhergestellten Blutplatten Subkulturen angelegt. Typisch gewachsene Koloniеformen von sämtlichen Primärplatten und ihren Subkulturen wurden in Leberbouillonröhrchen überzüchtet und nach 24 stündigem Wachstum im Haemolyseversuch geprüft.

Blutkörperchen: Hammel, Rind, Pferd, Kaninchen und Meerschweinchen; in den Versuchen mit Kolonien von Subkulturen nur die ersten 3 genannten Tierarten.

Kontrollen: Kochsalzlösung und unbeimpfte Leberbouillon.

Ergebnis: Das Wachstum der Rauschbrandkolonien auf den Primärplatten war, wenn von durch das Ausgangsmaterial selbst gegebenen Variationen abgesehen wird, auf den mit Rinderblut hergestellten Platten besser als auf den Pferdeblutplatten. Von den einzelnen Züchtungsverfahren erwies sich das Fortner-Verfahren als leistungsfähiger. In der Variation der Züchtungsverfahren wiesen auch hier wieder die nach Fortner bebrüteten Zeissler-Nährböden stärkere aerobe Verunreinigungen auf als die Fortner-Nährböden. Die Subkulturen auf den einzelnen Blutnährböden zeigten auch kein stärkeres Wachstum als auf den Primärplatten. Vor allem ist es durch Anlegen von Subkulturen nicht gelungen, das Wachstum der Rauschbrandkolonien auf den Pferdeblutplatten zu verbessern. Danach eignet sich das Pferdeblut als Ersatz für Hammel- oder Rinderblut zur Herstellung von Zeissler- oder Fortner-Platten nicht.

Auch in diesem Versuche erwiesen sich wieder die Blutkörperchen von Kaninchen und Meerschweinchen als wenig brauchbar, da sich damit zu wenig Unterschiede zwischen Rauschbrand- und Pararauschbrandstämmen ergaben. Auch die Pferdeblutkörperchen versagten. Es trat mit Rauschbrandstämmen in keinem Fall, dagegen mit 1 Pararauschbrandstamm einmal eine Haemolyse ein. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Kulturstämme erst über Pferdeblut- oder über Rinderblutplatten gezüchtet waren bezw. von den Subkulturen der genannten Platten stammten. Die Haemolyse mit Hammel- und Rinderblutkörperchen befriedigte wie in den früheren Versuchen. Unterschiede nach den Züchtungsverfahren oder je nach Verwendung von Kolonien der Primärplatten oder der Subkulturen ergaben sich nicht. Die Kontrollen arbeiteten mit allen Blutarten einwandfrei.

Der Versuch zeigt, daß die Züchtung auf Pferdeblutplatten schwer gelingt, daß Pferdeblut-, Meerschweinchenblut- und Kaninchenblutkörperchen sich für die Haemolysereaktion nicht eignen und daß eine Anpassung der Kulturstämme in ihrer haemolysierenden Wirkung auf Blutkörperchen verschiedener Tierarten durch das

vorherige Wachstum auf entsprechenden Blutarten nicht erreicht werden kann.

8. Änderungen in der Zusammensetzung der Leberbouillon

Es wurde bisher ermittelt, daß das Wachstum der Kulturstämme in den Leberbouillonröhrchen im Zusammenhang mit der Haemolysewirkung steht. Durch Zusatz von Stoffen, die bekanntermaßen das Wachstum von Anaerobiern oder die Bildung von Toxinen fördern, sollte ermittelt werden, ob damit die haemolysierenden Eigenschaften der Rauschbrandstämme erhöht werden können.

Kulturstämme: Je 3 bezw. 5 Rauschbrand- und Pararauschbrandstämme isoliert aus Frischfleisch im Zeissler-Verfahren. Außer Leberbouillon gewöhnlicher Herstellung wurden für die Reinkulturen auch Leberbouillonröhrchen mit Zusatz von 2% Traubenzucker (je 3 Kulturstämme) bezw. mit Zusatz von je 1 Messerspitze Kreide (je 5 Stämme) beigezogen.

Blutkörperchen von Hammel und Rind.

Kontrollen: Kochsalzlösung und die angegebenen Nährböden.

Ergebnis: Die Kontrollen arbeiteten einwandfrei (keine Haemolyse). Der Zusatz von Traubenzucker zur Leberbouillon erhöhte die haemolisierende Wirkung der Pararauschbrandstämme und setzte die der Rauschbrandstämme herab. Damit wird die Unterscheidung der Rauschbrand- und Pararauschbrandstämme erschwert bezw. unmöglich.

Der Zusatz von Kreide bietet keine Vorteile weder hinsichtlich der Reaktionsschnelligkeit noch auch hinsichtlich der Reaktionsstärke. Rinder- und Hammelblutkörperchen zeigten im allgemeinen das gleiche Verhalten.

C. Einfluß der Temperatur bei der Versuchsanstellung auf die Haemolyse-Reaktion

In früheren Versuchen war festgestellt worden, daß höhere oder niedere Temperaturen als Zimmertemperatur, wenn diese auf Kulturen oder abgegossene Kulturflüssigkeiten einwirkten, die haemolysierende Eigenschaft beeinflußten.

Die Haemolysereaktion selbst war bisher immer bei Zimmertemperatur ausgeführt worden. Es sollte nun festgestellt werden, ob die Umgebungstemperatur den Ablauf der Reaktion selbst beeinflussen konnte.

Kulturstämme: Je 5 Rauschbrand- und Pararauschbrandstämme nach dem Zeissler-Verfahren aus Frischfleisch isoliert, in Leberbouillon 24 Stunden bebrütet.

Blutkörperchen von Hammel und Rind.

Sämtliche zu dem Versuch benötigten Flüssigkeiten (abgegossene Kulturflüssigkeit und 3% Aufschwemmung der Blutkörperchen) wurden $^1/_4$ Stunde vor Versuchsanstellung in den Kühlraum (2—4°), in den Brutraum (37°) und in ein Wasserbad von 37° verbracht. Bei den gleichen Temperaturen wurde sodann die Reaktion angesetzt. Zur Kontrolle wurde außerdem der gleiche Versuch auch bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Ergebnis: Sämtliche Versuche befriedigten insofern als mit den Rauschbrandstämmen Haemolyse, mit den Pararauschbrandstämmen keine Haemolyse eintrat. Am besten war das Ergebnis bei Zimmertemperatur; hier trat die Haemolyse spätestens innerhalb 30 Minuten vollständig ein. Der Ablauf der Reaktion im Kühlraum verzögerte sich dem gegenüber bis zu 90 Minuten. Ähnlich war der Verlauf im Brutraum, auch hier war der Reaktionsablauf mit Hammelblutkörperchen innerhalb 90 Minuten abgeschlossen, mit Rinderblutkörperchen aber erst innerhalb 120 Minuten. Im Wasserbad von 37° wies die Mehrzahl der Rauschbrandstämme nach 2 Stunden noch keine vollständige Haemolyse auf.

Der Versuch lehrt, daß die Reaktion am besten bei Zimmertemperatur abläuft.

D. Abschließender Versuch

Es galt festzustellen, ob unter Anwendung der bisher gesammelten Erfahrungen über die brauchbarsten Einzelheiten im Untersuchungsverfahren Rauschbrand- und Pararauschbrandstämme in größerer Zahl auf Grund ihres Verhaltens im Haemolyseversuch unterschieden werden können.

Kulturstämme: Je 17 Rauschbrand- und Pararauschbrandstämme, nach dem Fortner-Verfahren aus Trockenfleischproben isoliert.

Die Pararauschbrandkolonien wurden jeweils nach 24 Stunden, die Rauschbrandkolonien nach 36 Stunden abgestochen und in Leberbouillonröhrchen (je Kolonieform 2) verbracht. Nach 24 Stunden Brutschrankaufenthalt wurde der Wachstumsgrad in den einzelnen Röhrchen festgestellt und danach der Haemolyseversuch angesetzt.

Blutkörperchen vom Hammel in 3%iger Aufschwemmung, außerdem zum Vergleich auch Blutkörperchen von Pferd und Rind in gleicher Konzentration. In den Versuchen mit Hammel- und Rinderblutkörperchen wurde eine 0,85%ige Kochsalzlösung beigezogen, in den Versuchen mit Pferdeblutkörperchen eine 0,95%ige, da nach Angaben von Morgenroth*) bei Haemolyseversuchen mit Pferdeblut diese stärkere Salzkonzentration sich mehr empfiehlt. Kontrollen: Kochsalzlösung und unbeimpfte Leberbouillon mit den verschiedenen Arten von Blutkörperchen.

Die in dem Versuch verwendete Blutkörperchenaufschwemmung betrug jeweils 2,0 ccm; an Kulturflüssigkeit wurden 0,1 ccm zugefügt. Die Reaktion wurde bei Zimmertemperatur angesetzt.

Ergebnis: Das Wachstum der Rauschbrandstämme in der Leberbouillon war gering. In den Versuchen mit Hammelblutkörperchen zeigten 14 von 17 Rauschbrandstämmen vollständige Haemolyse, die sich aber zum Teil bis 2 Stunden hinauszögerte. Demnach haben 3 Rauschbrandstämme versagt. Auf Grund dieser erstmaligen Feststellung eines Fehlergebnisses mit Rauschbrandstämmen möchte indessen noch nicht behauptet werden, daß es Rauschbrandstämme gibt, die keine Haemolysine bilden. Allenfalls hängen diese Fehlergebnisse damit zusammen, daß in diesem Versuche zum ersten Male Trockenfleischproben als Ausgangsmaterial beigezogen wurden; in den früheren Versuchen hatten stets Frischfleischproben oder früher hergestellte Reinkulturen als Ausgangsmaterial gedient.

Die Pararauschbrandstämme zeigten mit Hammelblutkörperchen keine Haemolyse.

Das Ergebnis war das gleiche bei der Verwendung von Rinderblutkörperchen. Die Pferdeblutkörperchen lieferten auch in diesem Versuch trotz Änderung der Kochsalzkonzentration keine Haemolyse.

*) Siehe Literaturverzeichnis Nr. 25

In den Kontrollröhrchen trat keine Haemolyse auf.

Der Versuch zeigt, daß — abgesehen von wenigen Ausnahmen — Rauschbrand- von Pararauschbrandkulturen im Haemolyseversuch unterschieden werden können.

Zusammenfassung

Nach den vorliegenden Versuchen läßt sich die Haemolyse-Reaktion, die von M. Bernard angegeben wurde, zur Unterscheidung von Rauschbrand- und Pararauschbrandstämmen verwenden.

Ich habe versucht, das von M. Bernard angegebene Verfahren unter verschiedenen Gesichtspunkten zu variieren, um festzustellen, ob bei allenfallsigen größeren oder kleineren Abweichungen das Versuchsergebnis beeinflußt werden kann.

Meine Untersuchungen erstreckten sich dabei auf Variationen der im Haemolyseversuch benützten Blutkörperchen, hinsichtlich der Tierarten, von denen sie gewonnen wurden, hinsichtlich ihrer Konzentration und ihrer Haltbarkeit. Ferner wurden die Kulturen hinsichtlich der zum Versuch benützten Menge, der Bebrütungszeit, des Einflusses von Temperaturen und der Nährbodenfolge variiert; außerdem wurde die Isolierung der Kulturstämme nach verschiedenen Plattenzüchtungsverfahren sowie Änderung in der Zusammensetzung der Leberbouillon geprüft. Weiter wurde der Einfluß der Umgebungstemperatur auf den Ablauf der Haemolyse-Reaktion festgestellt. In einem abschließenden Versuch wurde dann noch eine größere Anzahl von Rauschbrand- und Pararauschbrandstämmen unter Zugrundelegung der in den vorhergehenden Versuchen gesammelten Beobachtungen der Haemolyse-Reaktion unterstellt.

Eine kritische Würdigung meiner Versuche führt zu folgendem zusammenfassenden Ergebnis: Die Haemolyse-Reaktion zeigt die besten Ergebnisse, wenn nach den Angaben von M. Bernard gearbeitet wird. Danach sind folgende Einzelheiten zu beachten: Verwendung einer 3%igen Blutkörperchenaufschwemmung in der Menge von 0,2 ccm, einer gut gewachsenen, in Leberbouillon gezüchteten Reinkultur in der Menge von 0,1 ccm, Zusatz von 2,0 ccm physiolog. Kochsalzlösung (0,85%), Anstellung der Reaktion bei Zimmertemperatur und Einhalten einer Beobachtungszeit von 2 Stunden.

Folgende, in meinen Versuchen festgestellte Einzelheiten erscheinen erwähnenswert: Statt Blutkörperchen vom Hammel können auch solche vom Rind zur Haemolyse-Reaktion benützt werden. Die Blutkörperchen anderer Tierarten eignen sich nicht. Die zur Prüfung stehenden Kulturstämme müssen unmittelbar vor Anzüchtung in Leberbouillon über Blutplatten passiert werden. Ob dabei das Zeissler- oder Fortner-Verfahren verwendet wird, spielt keine Rolle.

Zur Herstellung der Zeissler- und Fortner-Platten kann dabei statt Hammelblut Rinderblut verwendet werden; Pferdeblut eignet sich indessen schlecht. Weitere Modifikationen der Kolonien nach Wuchsform und mikroskopischem Aussehen außer den bereits bekannten wurden in Verwendung der 3 verschiedenen Blutarten zur Herstellung der Zeissler- und Fortner-Platten nicht beobachtet.

Kulturstämme der verschiedensten Wuchsformen auf der Zeissler- oder Fortner-Platte zeigten im Haemolyseversuch das gleiche Verhalten: Rauschbrandkolonien lösten die roten Blutkörperchen, Pararauschbrandkolonien dagegen nicht.

Gutes oder schlechtes Wachstum der Leberbouillonkulturen beeinflussen die Reaktion. Weniger ausschlaggebend ist eine allenfallsige Verunreinigung mit aeroben Keimen: Bei sonst gutem Wachstum der Rauschbrandkulturen trat doch Haemolyse ein.

Am Schlusse meiner Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Direktor Dr. Drescher für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung des Materials sowie für die gütige Anleitung und Beratung während der Arbeit meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Auch Herrn Veterinärmedizinalrat Hahn bin ich für die freundliche Anleitung und Beihilfe bei der Durchführung meiner Versuche zu großem Danke verpflichtet.

Literatur-Verzeichnis

[1]) Arrhenius und Madsen. Das Tetanolysin und das Witte-Pepton. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 1906, Bd. 40, S. 409.

[2]) Bernard M. Die Häemolyse im Reagenzglas, ein Unterscheidungsmittel zwischen Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillen „Hammelblutkörperchenreaktion". T.R. 1933, Nr. 4, S. 65.

[3]) Bull und Pritschnett. Toxin and Antitoxin of, and protecting against, Bac. Welchii. J. of exp. med. 1917, 26 P 119 zitiert nach Zeissler. Hdb. f. path. Mikroorganismen von Kolle-Kraus-Uhlenhuth. Bd. IV, 2, S. 1105, 3. Auflg.

[4]) Costa und Troisier. Action hémolytique de certaines bactéries anaérobies des blessures de guerre. C.R. Soc. Biol. 1915, 78 p 354. Zit. nach Zeissler. Hdbch. f. path. Mikroorganismen von Kolle-Kraus-Uhlenhuth. Bd. IV, 2; S. 1104, 3. Auflage.

[5]) Ehrlich. Diskussionsbemerkungen (Crotin und Tetanolysin) zum Vortrag von Rossel: Zur Kenntnis der Antitoxinwirkung. Ges. d. Charité-Ärzte 3. II. 1898. B. kl. W. 1898. Nr. 12, S. 273.

[6]) Eijkmann. Zit. nach Přibram. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. 3. Auflage von Kolle-Kraus-Uhlenhuth. Bd. II, 1, S. 575.

[7]) Eisenberg. Leukocydine und Haemolysine bei den Anaerobiern. Ann. Pasteur 1908, Bd. 22, S. 430.

[8]) Fortner. Ein einfaches Plattenverfahren zur Züchtung strenger Anaerobier (anaerobe Bazillen — filtrierbare anaerobe Bakterien — Spirochaeta pallida). Zbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1928, Bd. 108, S. 155.

[9]) Fortner. Demonstration zur Technik der Anaerobiose. Sitzg. vom 13. II. 1928 d. Berliner mikrob. Gesellsch. ref. Zbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1928, Bd. 89, S. 286.

[10]) Fortner. I. Zur Technik der anaeroben Züchtung. II. Zur Differenzierung der Anaerobier. Zbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1929, Bd. 110, S. 233.

[11]) Fortner. Die Reinzüchtung der fusiformen Bazillen aus dem Zahnbelag. Zbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1929, Bd. 112, S. 388.

[12]) Fortner. Die Mikroskopie der aeroben und anaeroben Oberflächenkolonien auf hängendem Agar. Zbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1930, Bd. 115, S. 96.

[13]) Fortner. Zur Frage der Veränderlichkeit anaerober Bazillen (Fraenkelscher Gasbrandbazillus — Nekrosebazillus — Bac. Botulinus) Sitzung der Berliner Mikr. Gesellschaft vom 27. V. 1930, Zbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 1930, Bd. 98, S. 333.

[14]) Fortner. Neuzeitliche Oberflächenkultur und Mikroskopie der Anaerobier (dargestellt am Beispiel des Bac. Botulinus) Zeitschr. f. Inf. Krankh. d. Haustiere, 1931, Bd. 40, S. 258.

[15]) Foth. Rauschbrand. Hdb. d. path. Mikroorganismen von Kolle-Kraus-Uhlenhuth. 3. Aufl. Bd. IV, 2, S. 1213.

[16]) Henry. Zit. n. Zeissler, Kolle-Kraus-Uhlenhuth. 3. Aufl. 1930, Bd. IV, 2, S. 1105.

[17]) Kadisch. Das Haemotoxin d. Fraenkelschen Gasbazillus. Biochem. Ztschr. 1923, 42, S. 29.

[18]) Koch R. Zit. nach Přibram. Hdbch. f. path. Mikroorganismen, 3. Aufl. Bd. II, 1, S. 575.

[19]) Korentschewsky. Contribution à l'étude biologique du „Bac. perfringens" et du „Bac. putrificus" Ann. Pasteur, 1909, 23, p 91. Zit. nach Zeissler, Hdb. f. path. Mikroorganismen von Kolle-Kraus-Uhlenhuth. Bd. IV, 2, S. 1104, 3. Auflage.

[20]) König. Untersuchungen über das Vorkommen von Rauschbrandbazillen im Fleisch geschlachteter Rinder. Inaug. Diss. München 1932.

[21]) Kraus-Uhlenhuth. Handbuch der mikrobiolog. Technik, Bd. 2, 1923.

[22]) Laubenheimer. Zit. nach Zeissler, Kolle-Kraus-Uhlenhuth. 3. Aufl. Bd. X, S. 60.

[23]) Madsen. Über Tetanolysin. Ztsch. f. Hyg. 1899, Bd. 32. Zit. nach Přibram, Kolle-Kraus-Uhlenhuth. Bd. II, 1, S. 575, 3. Auflage.

[24]) Madsen und Walbum. Zit. nach Přibram, Hdb. f. path. Mikroorganismen von Kolle-Kraus-Uhlenhuth. 3. Aufl. Bd. II, S. 581.

[25]) Morgenroth. Methodik der Haemolysinuntersuchung. P. Ehrlichs ges. Arb. zur Imm. Forschung Berlin 1904. Zit. nach Sachs. Hdb. f. path. Mikroorganismen von Kolle-Kraus-Uhlenhuth, 3. Aufl. 1930, Bd. III, S. 274.

[26]) Nicolle, Césari und Raphael. Etudes sur le Vibrion septique et le „Bakterium Chauvoei". Ann. Pasteur, 1915, 29, p 165. Zit. nach Zeissler, Hdb. f. path. Mikroorganismen von Kolle-Kraus-Uhlenhuth. 3. Aufl. Bd. IV, 2, S. 1123.

[27]) Ouranoff. Sur hémotoxin du Bac. Welchii (Bac. perfringens) c. R. soc. biol. 1917, 80, p 706. Zit. nach Zeissler. Hdb. f. path. Mikroorganismen von Kolle-Kraus-Uhlenhuth. 3. Aufl. Bd. IV, 2, S. 1105.

[28]) Peskind. Zit. nach Přibram. Hdb. f. path. Mikroorganismen von Kolle-Kraus-Uhlenhuth. 3. Aufl. Bd. II, S. 577.

[29]) Přibram. Haemotoxine und Antihaemotoxine der Bakterien. Hdb. f. path. Mikroorganismen von Kolle-Kraus-Uhlenhuth. 3. Aufl. Bd. II, S. 575.

[30]) Schloßberger. Die Haemotoxine der Gasbrandbakterien. Arb. Inst. exp. Therm. Frankfurt 1919, H. 6. S. 33.

[31]) Schloßberger. Die Haemotoxine der Gasbranderreger. Arb. Inst. exp. Therm. Frankfurt 1919, H. 7, S. 3.

[32]) Schreiber. Die Rauschbranddiagnose mit dem Fortnerverfahren. Inaug. Diss. Gießen 1933.

[33]) Simonds. Zit. nach Zeissler. Hdb. f. path. Mikroorganismen von Kolle-Kraus-Uhlenhuth, 3. Aufl. Bd. IV, 2, S. 1104.

[34]) Walbum. Studien über Toxinbildung. Zeitschr. f. Imm. Forsch. 1909, Bd. 3, S. 70.

[35]) Weinberg und Séguin. Zit. nach Zeissler. Hdb. f. path. Mikroorganismen von Kolle-Kraus-Uhlenhuth, 3. Aufl. Bd. IV, 2, S. 1105.

[36]) Wuth. Serologische und biochemische Studien über das Haemolysin des Fraenkelschen Gasbacillus. Biochem. Ztsch. 1923, 142, S. 19.

[37]) Wuth. Die Konstitution des Oedemlysins. M. m. W. 1919, S. 175.

[38]) Zeissler. Die Gasödeminfektion des Menschen. Hdb. f. path. Mikroorganismen von Kolle-Kraus-Uhlenhuth. 3. Aufl. 1930, Bd. IV, 2, S. 1097.

[39]) Zeissler. Anaerobenzüchtung. Hdb. f. path. Mikroorganismen von Kolle-Kraus-Uhlenhuth. 3. Aufl. 1930, Bd. 10, S. 35.

Lebenslauf

Am 29. November 1904 wurde ich, Georg Grimm, als Sohn des kgl. bayer. Majors Georg Grimm und seiner Ehefrau Maria geb. Dietz in München geboren. In Nürnberg besuchte ich die Volksschule. Das Realgymnasium besuchte ich in Nürnberg und München. Ich trat dann in die Reichswehr ein und war bis November 1926 bei der 7. bayer. Fahrabteilung 2. Eskadron. Ich schied dann aus, um mich dem Studium der Tierheilkunde zu widmen. Meine Semester verbrachte ich in München und Wien. Die Approbation als Tierarzt erhielt ich in München im Jahre 1933. Anschließend brachte ich im Rahmen des Vorbereitungsdienstes für den Staatsdienst 3 Monate am Münchner Schlachthof zu.

Ab November 1933 war ich mit der Anfertigung vorliegender Arbeit beschäftigt; nebenher leistete ich als Praktikant an der Veterinärpolizeilichen Anstalt in Schleißheim meinen staatlichen Vorbereitungsdienst ab.